

Vježba 3: Dokazivanje aminokiselina i proteina obojenim reakcijama

Broj nastavnih sati: 3

UVOD:

Obojene reakcije za dokazivanje aminokiselina i proteina temelje se na dokazivanju peptidne (amidne) veze ili na dokazu pojedinih aminokiselina, odnosno funkcionalnih skupina koje sadržava pojedina aminokiselina.

Najpoznatije su sljedeće obojene reakcije na proteine:

- ❖ biuret reakcija - dokaz peptidne veze
- ❖ reakcija s olovnim (II) acetatom - dokaz proteina koji u svojoj strukturi sadržavaju aminokiseline sa sumporom (cistein, metionin)
- ❖ ksantoproteinska reakcija - dokaz proteina koji u svojoj strukturi sadržavaju aromatske aminokiseline (npr. tirozin)
- ❖ ninhidrinska reakcija - sve aminokiseline i proteini pokazuju pozitivnu ninhidrinsku reakciju
- ❖ Hopkin-Colova reakcija - dokaz proteina koji u svojoj strukturi sadržavaju aminokiseline s indolnim prstenom (npr. triptofan)
- ❖ reakcija s Millonovim reagensom - dokaz proteina koji u svojoj strukturi sadržavaju aminokiseline s fenolnim prstenom (npr. tirozin)
- ❖ reakcija prema Sakaguchiju - dokaz proteina koji u svojoj strukturi sadržavaju aminokiselinu s gvanidino skupinom (arginin)

Praktični rad 1 : Biuret reakcija

ZADATAK: obojenom reakcijom dokazati prisutnost proteina

PRIBOR: stalak s epruvetom, kapaljke

KEMIKALIJE : - otopina NaOH ($c= 2 \text{ mol/ dm}^3$)
- otopina CuSO₄ ($c= 0,05 \text{ mol/ dm}^3$)

UZORAK: otopina bjelanjka

Priprema uzorka: bjelanjak se u čaši odvoji od žutanjka, te se doda trostruki volumen vode.
Nakon miješanja staklenim štapićem, otopina se profiltrira preko lijevka s filter papirom.

POSTUPAK:

1. Otopinu bjelanjka zaluziti s nekoliko kapi NaOH i dodati nekoliko kapi razrijeđene CuSO₄. Otopina se oboji u ljubičasto.

Objašnjenje: Ovo je opći test na proteine te nije specifičan za pojedine aminokiseline.

Naziv potječe od spoja biuret koji nastaje kondenzacijom dviju molekula uree uz izdvajanje amonijaka. Opisanu reakciju daju svi spojevi koji u molekuli imaju ketoimidnu (peptidnu vezu).

CRTEŽ :

Praktični rad 2 : Reakcija s olovnim (II) acetatom

ZADATAK: obojenom reakcijom dokazati prisutnost aminokiselina sa sumporom

PRIBOR: epruveta, kapaljke, drvena hvataljka, vodena kupelj

KEMIKALIJE : - otopina NaOH ($c= 2 \text{ mol/ dm}^3$)
- otopina olovnog (II) acetata ($c= 0,05 \text{ mol/ dm}^3$)

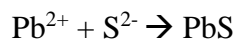
UZORAK: otopina bjelanjka

Priprema uzorka: bjelanjak se u čaši odvoji od žutanjka, te se doda trostruki volumen vode. Nakon miješanja staklenim štapićem, otopina se profiltrira preko lijevka s filter papirom.

POSTUPAK:

1. Otopini bjelanjka dodati otopinu NaOH i nekoliko kapi olovnog (II) acetata, kuhanjem smjesa postaje smeđa od koloidno izlučenog PbS.

Objašnjenje: kuhanjem je smjesa postala smeđa od koloidno izlučenog PbS.



Pokazuju je aminokiseline koje sadrže sumpor (cistein, metionin).

CRTEŽ :

Praktični rad 3 : Ksantoproteinska reakcija

ZADATAK: obojenom reakcijom dokazati prisutnost aminokiselina s aromatskim prstenom

PRIBOR: epruveta, kapaljke, pipeta, propipeta, vodena kupelj, univerzalni indikator papir

KEMIKALIJE : - otopina NaOH ($c=2 \text{ mol/ dm}^3$)
- konc. HNO_3

UZORAK: otopina bjelanjka

Priprema uzorka: bjelanjak se u čaši odvoji od žutanjka, te se doda trostruki volumen vode. Nakon miješanja staklenim štapićem, otopina se profiltrira preko lijevka s filter papirom.

POSTUPAK:

1. U 2 cm^3 otopine bjelanjka u epruvetu dodati nekoliko kapi konc. HNO_3 i smjesu zagrijavati nekoliko minuta na vodenoj kupelji. Kad se otopina ohladi dodati NaOH do lužnate reakcije koja se ispita indikator papirom, pri čemu žuta boja prelazi u narančastu.

Objašnjenje: tu reakciju daju aromatske aminokiseline kao što su tirozin, triptofan, fenilalanin. Ovu reakciju daju i čvrste bjelančevine jer ako dušičnu kiselinu kapnemo na kožu nastaje žuto obojenje.

CRTEŽ :

REZULTATI RADA:

a) **Tablica 1 : dokazivanje aminokiselina obojenim reakcijama**

VRSTA OBOJENE REAKCIJE	REAGENS	IZGLED TALOGA
Biuret reakcija	NaOH , CuSO ₄	
Reakcija s olovnim (II) acetatom	NaOH, olova (II) acetat	
Ksantoproteinska reakcija	NaOH, HNO ₃	

ZAPAŽANJA I ZAKLJUČAK:

PONAVLJANJE I VREDNOVANJE:

1. Na čemu se temelje obojene reakcije za dokazivanje aminokiselina i proteina?
2. Koji je princip biuret reakcije i što se njome dokazuje?
3. Koji je princip reakcije s olovnim (II) acetatom i što se njome dokazuje?
4. Koji je princip ksantoproteinske reakcije i što se njome dokazuje?

LITERATURA:

1. Burger, N. i sur., Materijali za vježbe iz biokemije za studente stomatologije, Interna skripta, Stomatološki fakultet Zagreb, Zagreb, 2014.
2. Kučak, A. , Vježbe iz biokemije, Profil, Zagreb, 2003.
3. Trajković, J. , Analize životnih namirnica, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd,1983.
4. Flogel,G.Lauc, Biokemijski praktikum za srednje škole, Školska knjiga, Zagreb, 1998.
5. Primorac, Lj., Kontrola kakvoće hrane, propisi za vježbe, Prehrambeno tehnološki fakultet Osijek, 2007.